

На правах рукописи



Малыгина Татьяна Юрьевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОПЛАЗМ К
ФТОРХИНОЛОНАМ: ГЕНОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛИ У
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ
ШТАММОВ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8B**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ патогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный руководитель: **Чернов Владислав Моисеевич**
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: **Лазарев Василий Николаевич**
доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией генной инженерии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА, г. Москва

Кипенская Лариса Викторовна
кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанской государственной медицинской академии, г. Казань

Ведущая организация: Смоленский государственный медицинский университет, НИИ антимикробной химиотерапии, г. Смоленск

Защита состоится «16» декабря 2016 года в «11» часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета (аудитория № 205А).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Автореферат разослан «___» ноября 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

Постановка проблемы и ее актуальность. Большой интерес исследователей к микоплазмам (класс Mollicutes) связан с уникальностью организации мельчайших бактерий, лишенных клеточной стенки, и практической необходимостью. Ограниченные биохимические возможности микоплазм не препятствуют широкому распространению в природе этих бактерий, преодолению защитных систем высших организмов и персистенции. Большинство микоплазм – паразиты высших эукариот, некоторые – возбудители социально значимых инфекций, основные контаминанты клеточных культур и вакцинных препаратов. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему для здравоохранения и сельского хозяйства, фундаментальных исследований и практических работ, связанных с клеточными технологиями и биотехнологическим производством (Rottem *et al.* // In: Biomedical Tissue Culture. InTech, 2012). Микоплазмы быстро адаптируются к стрессовым условиям и оперативно развивают устойчивость к антибактериальным препаратам (АБП). Однако антибиотикотерапия, связанная с применением фторхинолонов (главным образом ципрофлоксацина, в том числе в сочетании с тетрациклином и антибиотиками группы макролидов), пока остается единственным рекомендуемым способом подавления микоплазм (Waites *et al.* // In Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. UK: Caister Academic Press. 2014). Предполагается, что решение проблемы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур лежит на пути исследований механизмов устойчивости бактерий к АБП, выявления молекулярных основ адаптации микоплазм к стрессорам (Nikfarjam, Farzaneh // Cell J. 2012. Vol.13, №.4). Проведение этих исследований предполагает использование комплексного подхода с привлечением как классических методов, так и современных способов анализа биологического материала.

Омикс технологии открыли новые возможности для выявления бактериальных *резистомов* – совокупности генов и их продуктов, которые вовлечены в формирование устойчивости микроорганизмов к АБП (D'Costa // Science. 2006. Vol.311, №.5759). Сведения по резистомам ряда бактерий, основанные на геномном и протеомном профилировании различающихся по чувствительности к антибиотикам штаммов микроорганизмов, уже появились (Wright // Handb Exp Pharmacol. 2012. Vol.211; Liu // J Proteome Res. 2014. Vol.13, №.3). Однако в отношении микоплазм такие данные пока отсутствуют.

Уникальным видом микоплазм с точки зрения адаптивности является *Acholeplasma laidlawii* – широко распространенная в природе микоплазма, обнаруживаемая у человека, животных, растений, являющаяся возбудителем фитомикоплазмозов и основным контаминантом клеточных культур (Чернов с соавт. // Acta Naturae. 2014. Т.6, №3). Относительная простота культивирования, наличие в базах данных полной нуклеотидной последовательности генома, а также протеома в разных условиях роста *A.laidlawii* (Chernov *et al.* // J. Proteomics. 2011. Vol.74; Lazarev *et al.* // J. Bacteriol. 2011. Vol.193) определяют возможность использования этой бактерии в качестве удобного объекта для исследований молекулярных механизмов устойчивости микоплазм к АБП. Недавно было показано участие в адаптации к АБП у бактерий внеклеточных везикул (ВВ) – сферических, окруженных мембраной наноструктур, диаметром менее 0.2 мкм (Rumbo *et al.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V.55; Lee *et al.* // Antimicrob Agents Chemother. 2013. Vol.57). Везикулы опосредуют универсальный путь секреции у всех организмов и обеспечивают

транспорт широкого спектра соединений, сигналинг, межклеточные взаимодействия и, соответственно, адаптацию к разным условиям среды (Kulp, Kuehn // Rev. Microbiol. 2010. Vol.64). Это определяет необходимость учета везикулярного трафика в исследованиях механизмов развития устойчивости бактерий к АБП.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – выявление особенностей геномного профиля, а также клеточного и везикулярного протеомов у штаммов *A. laidlawii* с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину.

Задачи исследования:

1. Получить штаммы *A. laidlawii*, различающиеся по чувствительности к ципрофлоксацину – проявляющие повышенную и пониженную устойчивость к АБП, и провести сравнительный анализ их в отношении эффлюкса антибиотика и везикуляции.

2. Провести сравнительный анализ спектра нуклеотидных последовательностей ДНК *A. laidlawii* в составе внеклеточных везикул у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов микоплазмы.

3. Провести сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей ДНК клеток у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*.

4. Провести сравнительный анализ протеомов клеток у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*.

5. Провести сравнительный анализ протеомов внеклеточных везикул, продуцируемых клетками различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*.

6. Провести сравнительный анализ генотоксичности внеклеточных везикул, продуцируемых клетками различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*.

Научная новизна. Впервые показано, что внеклеточные везикулы *A. laidlawii* участвуют в развитии устойчивости микоплазмы к фторхинолонам – опосредуют перенос ципрофлоксацина и мутантных генов целевых белков. Установлено, что развитие устойчивости микоплазмы к ципрофлоксацину сопровождается изменениями в геномном и протеомном профилях микоплазмы, связанными не только с генами мишеней фторхинолонов и соответствующих целевых белков, но и многими другими генами и белками, которые участвуют в фундаментальных клеточных процессах, универсальном каскаде стрессового ответа бактерий и реализации вирулентности.

Научно-практическая значимость. Результаты работы вносят вклад в понимание молекулярно-генетических основ развития устойчивости *A. laidlawii* PG8B к антибактериальным препаратам. Данные геномного и протеомного профилирования, а также анализа генотоксичности внеклеточных везикул штаммов с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину могут быть востребованы в фундаментальных и прикладных исследованиях, связанных с разработкой эффективной системы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур, в здравоохранении, сельском хозяйстве и биотехнологическом производстве. Результаты исследований по определению специфичного набора нуклеотидных последовательностей генов в везикулах штаммов *A. laidlawii* могут

быть использованы при создании диагностических систем для дифференциальной детекции инфектов разного типа.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа в 2012-2016 гг. проводилась в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Взаимодействие микоплазм и эукариот: анализ структуры геномов, протеомов, транскриптомов».

Исследования автора, как исполнителя данной темы, поддержаны грантами **РФФИ** 12-04-31396 мол_а «Механизмы формирования устойчивости микоплазм к антибиотикам: секреция внеклеточных мембранных везикул и эффлюкс ципрофлоксацина у *A. laidlawii*» 2012-2013 гг, **РФФИ** 14-04-00883а «Секретом и межклеточная коммуникация бактерий: протеомный анализ внеклеточных везикул, продуцируемых микоплазмами в микробных сообществах» 2014-2016 гг, **РФФИ** 15-44-02594 р_поволжье_а «Молекулярные основы устойчивости микоплазм к антимикробным пептидам» 2015-2017 гг, **РФФИ** 16-34-00660 мол-а «Молекулярные основы формирования устойчивости микоплазм к тетрациклину: резистом *Acholeplasma laidlawii*» 2016-2017 гг и грантом Президента РФ № **МК-3823.2013**.

Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. АСМ проводили на базе кафедры оптики и нанофотоники Физического института ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ); СЭМ проводили на базе междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ, секвенирование геномов и идентификацию полипептидов проводили в НОЦ «Междисциплинарный центр протеомных исследований», КФУ. Анализ генотоксичности был выполнен в ООО «Клиника Нуриевых». Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам НОЦ «Междисциплинарный центр протеомных исследований» М.Н. Синягиной, Е.А. Булыгиной, А.В. Лайкову, сотруднику КФУ к.б.н. М.В. Трушину, сотрудникам Аналитического центра микроскопии КФУ Ю.Н. Осипову и В.В. Сальникову, а также врачу-генетику ООО «Клиника Нуриевых» Л.Р. Самойловой за возможность проведения совместных работ и помощь в экспериментах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Внеклеточные везикулы *A. laidlawii* участвуют в развитии устойчивости микоплазмы к фторхинолонам – опосредуют перенос ципрофлоксацина и мутантных генов целевых белков.

2. Развитие устойчивости к ципрофлоксацину у *A. laidlawii* сопровождается изменениями в геномном и протеомном профилях микоплазмы, связанными не только с генами мишеней фторхинолонов и соответствующими целевыми белками, но и многими другими генами и белками, которые участвуют в фундаментальных клеточных процессах, универсальном каскаде стрессового ответа бактерий и реализации вирулентности.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), IV Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия» (Иркутск, 2013), Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции для молодых учёных «Биология клетки в культуре» (С-Петербург, 2013), Международной конференции молодых ученых «Young Researches in Life Sciences» (Париж, Франция,

2014), 12-м конгрессе Американского общества анаэробов, 37-м конгрессе общества микробной экологии и болезней «Анаэробы 2014» (Чикаго, США, 2014), 50-й конференции FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 2014), 19-й Международной Пущинской школе-конференции «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2015), 6-м конгрессе микробиологов Европы «FEMS 2015» (Маастрихт, Нидерланды, 2015), 18-м симпозиуме студентов-биологов в Европе «Симбиоз 2015» (Александруполис, Греция, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 217 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, а также приложения. В работе представлено 22 таблицы и 21 рисунок. Список цитируемой литературы содержит 219 источников, из них 17 – в отечественных изданиях.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. Культивирование *A. laidlawii* PG8B на искусственных питательных средах. В работе использовали штамм *A. laidlawii* PG8B, полученный из коллекции микроорганизмов ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва). Культивирование *A. laidlawii* PG8B проводили при 37°C на модифицированной жидкой питательной среде Эдварда (ПСЭ).

1.2. Получение различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii* PG8B. Устойчивый штамм получали последовательным пересевом исходного штамма *A. laidlawii* PG8B в ПСЭ с возрастающей концентрацией антибиотика. В результате был получен штамм *A. laidlawii* PG8R₁₀, растущий при концентрации ципрофлоксацина 10 мкг/мл. Чувствительный штамм *A. laidlawii* PG8S получали путем отбора клонов исходного штамма, растущих при концентрации ципрофлоксацина ниже значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотика, определенной для *A. laidlawii* PG8B.

1.3. Для определения количества колониеобразующих единиц десятикратные разведения суспензии бактериальных клеток высевали на агаризованные питательные среды и инкубировали при 37°C. Число колониеобразующих единиц подсчитывали через 14 суток после посева (Пименова с соавт. // Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практическое пособие. 2-е изд. – М.: Изд-во Моск. ун-та. 1983).

1.4.1. Трансмиссивную электронную микроскопию (ТЭМ) клеток и ВВ микоплазмы проводили согласно (Cole // In: Methods in Mycoplasmaology. NY: Academic Press. Vol.1. 1983). Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (Швеция). Образцы просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Япония).

1.4.2. Атомно-силовую микроскопию (АСМ) клеток и ВВ микоплазмы проводили согласно (Braga, Ricci // Methods Mol. Biol. 2004. Vol.242). Образцы

просматривали на атомно-силовом микроскопе Solver P47H («НТ-МДТ», Россия). Для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 («НТ-МДТ», Россия).

1.4.3. Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) ВВ микоплазмы проводили согласно (Pich *et al.* // Microbiology. 2008. Vol.154, №10). Образцы просматривали на микроскопе Merlin Carl Zeiss (Германия).

1.5. Эффлюкс ципрофлоксацина клетками *A. laidlawii* определяли по изменению флуоресценции антибиотика в течение 60 минут на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (РФ) при длине волны возбуждения 282 нм и длине волны эмиссии 442 нм (Chapman, Georgopadakou // Antimicrob Agents Chemother. 1989. Vol.33).

1.6. Определение чувствительности *A. laidlawii* к антибиотикам проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде с градиентом концентрации АБП с последующим определением минимальной ингибирующей концентрации. Культуры инкубировали при 37°C. Рост культур оценивали визуально по изменению окраски фенолового красного.

1.7. Выделение и очистку внеклеточных везикул из культур различающихся по чувствительности к АБП штаммов *A. laidlawii* проводили согласно алгоритму (Lee *et al.* // Proteomics. 2009. Vol.9), модифицированному в соответствии с особенностями культивирования микоплазмы (Chernov *et al.* // J. Proteomics. 2014. Vol.110). Отсутствие в исследуемом препарате клеток проверяли при помощи ПЦР, ТЭМ и СЭМ.

1.8. Определение содержания ципрофлоксацина во внеклеточных везикулах штаммов *A. laidlawii* определяли по уровню флуоресценции АБП на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия) при длине волны возбуждения 282 нм и длине волны эмиссии 442 нм (Chapman, Georgopadakou // Antimicrob Agents Chemother. 1989. Vol.33).

1.9. Генотоксичность внеклеточных везикул *A. laidlawii* оценивали по влиянию ВВ на уровень митотической активности лимфоцитов периферической крови человека, а также частоту хромосомных и геномных нарушений в метафазных пластинках культивированных *in vitro* лимфоцитов. Препараты исследовали с помощью системы автоматического сканирования Metafer 4 с микроскопом проходящего света AxioImager.Z2 («Zeiss», Германия) и системы кариотипирования Ikaros («MetaSystems», Германия).

1.10. Протеомное профилирование клеток и внеклеточных везикул осуществляли с помощью 1D-LC-ESI-MS/MS (Lazarev *et al.* // J.Bacteriol. 2011. Vol.193). Масс-спектры белков получали на масс-спектрометре Maxis Impact (Bruker) и анализировали с использованием программы MASCOT (Matrix Science, Inc.).

1.11. Определение внутриклеточной локализации белков штаммов *A. laidlawii* проводили с помощью программы Psortb v3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>). Классификацию идентифицированных белков проводили в соответствии с функциональными категориями COG (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG).

1.12. Выделение и очистку нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из клеток штаммов *A. laidlawii* осуществляли с помощью метода фенольной экстракции (Маниатис с соавт. // Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984) и коммерческого набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

соответственно. Выделение ДНК из внеклеточных везикул микоплазмы проводили с использованием коммерческого набора «ДНК-экспресс» («Литех», Москва) согласно рекомендациям изготовителя.

1.13. Реакции обратной транскрипции и амплификации нуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР проводили со случайными гексамерными праймерами согласно рекомендациям фирмы-изготовителя обратной транскриптазы RevertAid™ M-MuLV («Fermentas», Литва) на программируемом амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

1.14. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле проводили в 0.8-2% агарозных гелях. ДНК окрашивали бромистым этидием и документировали с помощью видеосистемы DNA Analyzer («Литех», Россия).

1.15. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора «iQ iCycler» («Bio-Rad», США). Накопление продуктов ПЦР оценивали по эмиссии TaqMan зонда, оценку изменения экспрессии генов осуществляли с использованием метода (Pfaffl // Nucleic Acids Res. 2001. Vol.29).

1.16. Клонирование нуклеотидных последовательностей ряда генов осуществляли в плазмиде pGEM-T Easy Vector («Promega», США), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Секвенирование проводили с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits («Applied Biosystems», США), согласно инструкции фирмы изготовителя. Нуклеотидные последовательности ДНК определяли с помощью ДНК-анализатора 3130 Genetic Analyser («Applied Biosystems», США). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программе Sequencing Analysis 5.3.1 («Applied Biosystems», США) и пакете программ Informax Vector NTI Suite 9, а также с использованием базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и алгоритма Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.17. Полногеномное секвенирование штаммов *A.laidlawii* проводили на ДНК-секвенаторе GS Junior («Roche Diagnostics», Швейцария). Анализ нуклеотидных последовательностей делали в программе Sequencing Analysis 5.3.1 («Applied Biosystems», США), а также с использованием базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Сборку ДНК последовательностей *de novo* выполняли с использованием программного пакета Newbler («Roche Diagnostics», Швейцария), выравнивание нуклеотидных последовательностей – с использованием Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), а поиск и аннотация однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) – с использованием Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) и SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff.html>) соответственно.

1.18. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения MS Excel (Microsoft) и Origin 8.0. Сравнение средних значений проводили по критерию Стьюдента. При сравнении количества клеток в классах использовали критерий χ^2 .

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Штаммы *A. laidlawii*, различающиеся по чувствительности к ципрофлоксацину: получение и характеристика в отношении везикуляции и эффлюкса антибиотика

Выяснение молекулярных механизмов адаптации бактерий к антибиотикам предполагает сравнительный анализ штаммов микроорганизмов, проявляющих дифференциальную чувствительность к антибактериальным препаратам, в отношении морфофизиологических, биохимических и молекулярно-генетических аспектов. От исходного штамма *A. laidlawii* PG8B (МИК – 0.5 мкг/мл) нами были получены штаммы с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину – проявляющие повышенную устойчивость – *A. laidlawii* PG8R_{0.5} (МИК – 1 мкг/мл), а также *A. laidlawii* PG8R₁₀ (МИК – 20 мкг/мл) и чувствительность к АБП – *A. laidlawii* PG8S (МИК – 0.2 мкг/мл). Результаты сравнительного анализа свидетельствуют, что штаммы различаются в отношении удельной скорости роста культуры и времени генерации ($p < 0.05$; Таблица 2.1.1), а также динамики накопления ципрофлоксацина в клетках и его выведения ($p < 0.05$; Рисунок 2.1.1). Эффлюкс АБП у *A. laidlawii* PG8R₁₀ существенно превосходит ($p < 0.05$) эффлюкс *A. laidlawii* PG8B и *A. laidlawii* PG8S. При этом значимые изменения экспрессии генов гомологов ABC-транспортеров, ассоциированных с мультилекарственной устойчивостью, у штамма, проявляющего повышенную устойчивость к антибиотику, не обнаружены.

Таблица 2.1.1. Показатели удельной скорости роста и времени генерации *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S при культивировании штаммов на ПСЭ

Штамм	Удельная скорость роста (μ), ч^{-1}	Время генерации (g), ч
<i>A. laidlawii</i> PG8B	0.106 ± 0.005	6.57 ± 0.134
<i>A. laidlawii</i> PG8B, обработанный ципрофлоксацином	$0.05 \pm 0.007^*$	$13.87 \pm 0.693^*$
<i>A. laidlawii</i> PG8R ₁₀	0.094 ± 0.002	$7.38 \pm 0.233^*$
<i>A. laidlawii</i> PG8R ₁₀ на ПСЭ без ципрофлоксацина	$0.065 \pm 0.003^*$	$10.7 \pm 0.509^*$
<i>A. laidlawii</i> PG8S	0.107 ± 0.063	6.46 ± 0.323

* – $p < 0.05$ по сравнению с показателями удельной скорости роста и времени генерации штамма *A. laidlawii* PG8B.

Результаты ТЭМ (наряду с данными ПЦР) свидетельствуют, что культуры различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов микоплазмы аксеничны – содержат типичные, характерные для микоплазм клетки диаметром 0.3-0.8 мкм. Согласно данным ТЭМ, СЭМ и АСМ, клетки различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii* продуцируют везикулы, которые обнаруживаются в культуре микоплазмы как на поверхности клеток, так и обособленно; имеют сферическую форму, но гетерогенны по размерам и электронной плотности (Рисунок 2.1.2). Диаметр большинства везикул в культурах всех штаммов

варьирует от 50 до 120 нм. Количество секретируемых везикул в пересчете на клетку в культурах штаммов достоверно не различается ($p > 0.05$).

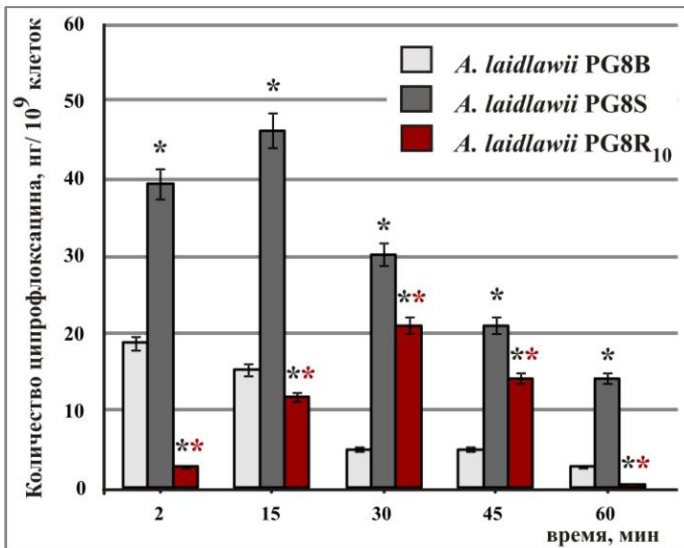


Рисунок 2.1.1. Изменение содержания ципрофлоксацина в клетках штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину. * – $p < 0.05$ по сравнению с содержанием ципрофлоксацина в клетках штамма *A. laidlawii* PG8B. *** – $p < 0.05$ по сравнению с содержанием ципрофлоксацина в клетках штамма *A. laidlawii* PG8S.

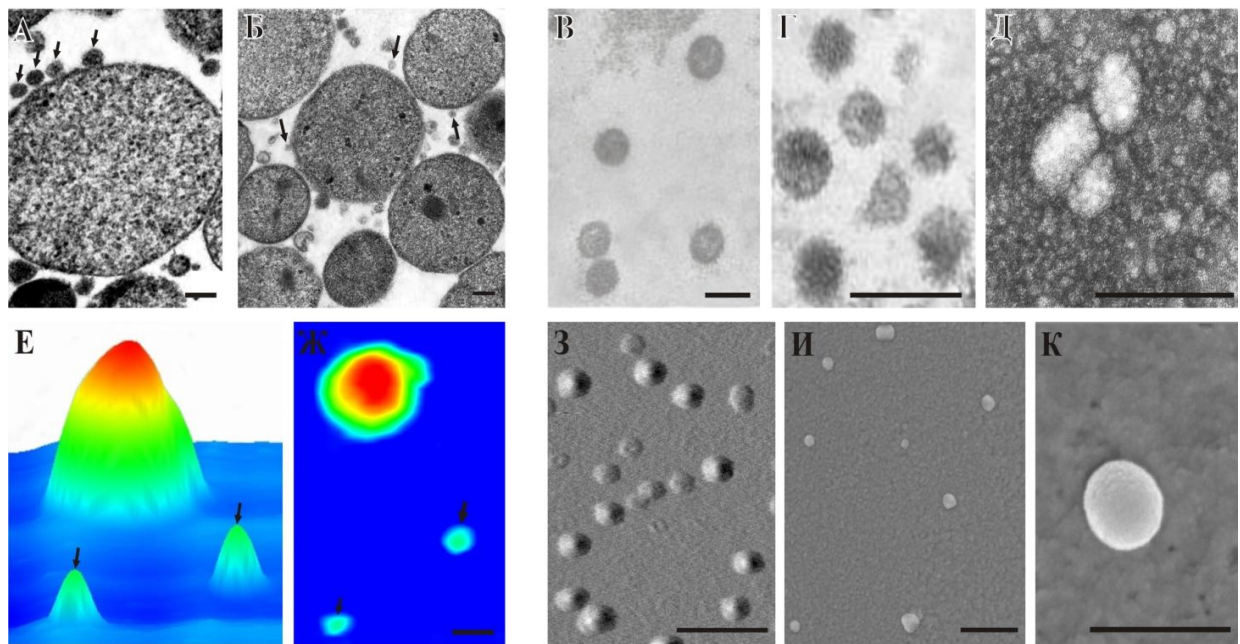


Рисунок 2.1.2. Микрографии клеток *A. laidlawii* (А, Б, Е, Ж) и изолированных ВВ (В, Г, Д, З, И, К). А, Б, В, Г, Д – ТЭМ; Е, Ж, З – АСМ; И, К – СЭМ. Е, З, И, К – 3D; Ж – 2D. Длина отрезка 200 нм.

2.2. Сравнительный анализ состава нуклеотидных последовательностей ДНК *A. laidlawii* во внеклеточных везикулах у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов микоплазмы

В составе везикул ряда бактерий обнаружены нуклеотидные последовательности ДНК и РНК, которые могут играть существенную роль в межклеточных взаимодействиях микро- и макроорганизмов, связанную с

горизонтальным переносом генов, оперативной адаптацией к стрессорам, формированием бактериальных биопленок и реализацией вирулентности (Kim *et al.* // Semin Cell Dev Biol. 2015. Vol.40; Ho *et al.* // PLoS One. 2015. Vol.10). При этом специфичный набор последовательностей нуклеиновых кислот в составе ВВ может использоваться в качестве маркеров, необходимых для оценки чистоты выделенных препаратов, актуальной при анализе содержания соответствующих внеклеточных органелл микроорганизмов.

Полученные нами данные свидетельствуют, что состав нуклеотидных последовательностей ДНК, секретируемых клетками штаммов с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину, имеет некоторые особенности (Таблица 2.2.1), которые позволяют определиться с универсальными маркерами ВВ штаммов микоплазмы и предложить праймеры для амплификации *pnp*, *tufB*, *ftsZ* и спейсерной зоны 16S-23S рРНК в качестве зондов для дифференциальной детекции везикул и клеток микоплазмы – оценки чистоты препаратов ВВ, т.е. отсутствия в них клеточного дебриса бактерии.

Таблица 2.2.1. Результаты амплификации нуклеотидных последовательностей ДНК, выделенных из ВВ, секретируемых клетками различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*

Ген	Кодируемый геном продукт	<i>A. laidlawii</i>		
		PG8B	PG8R ₁₀	PG8S
<i>ftsZ</i>	Белок клеточного деления FtsZ	-	-	-
спейсер 16S-23S рРНК	-	-	-	-
<i>trx</i>	Тиоредоксин	+	+/-	+/-
<i>pnp</i>	Полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансфераза	+	+	+
<i>pdhB</i>	β-субъединица пируватдегидрогеназы E1	+	+/-	-
<i>tufB</i>	Фактор элонгации EF-Tu	+	+	+
<i>ackA</i>	Ацетаткиназа	+	+/-	-
<i>acl_0309</i>	Белок суперсемейства металло-β-лактамаз	+/-	+/-	-
<i>rpoB</i>	β-субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы	+	+	-
<i>gyrA</i>	α-субъединица ДНК-гиразы	+	+	-
<i>parC</i>	α-субъединица ДНК-топоизомеразы IV	+	+	+

«+» – всегда присутствует; «-» – всегда отсутствует; «+/-» – амплификация не стабильна.

Использование везикулярных маркеров определило возможность проверки участия везикул в адаптации *A. laidlawii* к ципрофлоксацину, связанную с выведением АБП из клеток микоплазмы. В случае культивирования микоплазмы на средах в присутствии ципрофлоксацина в везикулах всех штаммов регистрируется ципрофлоксацин. Однако количество АБП в составе везикул у *A.laidlawii* PG8R₁₀ достоверно превосходит ($p < 0.05$) соответствующие показатели штаммов *A.laidlawii* PG8B и *A.laidlawii* PG8S. Полученные данные свидетельствуют о том, что внеклеточные везикулы *A.laidlawii* опосредуют перенос ципрофлоксацина и участвуют в развитии устойчивости микоплазмы к АБП.

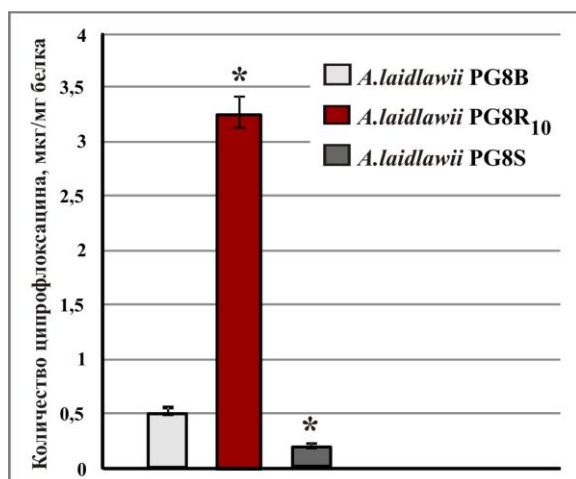


Рисунок 2.2.1. Количество ципрофлоксацина в везикулах штаммов *A. laidlawii*, культивированных на средах в присутствии ципрофлоксацина.

* – $p < 0.05$ по сравнению с содержанием ципрофлоксацина в везикулах штамма *A. laidlawii* PG8B.

Как следует из данных таблицы 2.2.1, везикулы, продуцируемые клетками штаммов микоплазмы, содержат копии последовательностей генов мишеней фторхинолонов. В случае *A. laidlawii* PG8R₁₀ ВВ, как оказалось, транспортируют мутантные гены целевых белков. Так, в последовательности *gyrA*-гена штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀ нами была обнаружена точечная мутация (Г-271-Т, определяющая замену Asp-91-Tyr), которая также регистрировалась в транспортируемой везикулами нуклеотидной последовательности гена. Аналогичная ситуация наблюдалась и для последовательности гена *parC* – транзиция (Ц-272-Т, определяющая замену аминокислоты Ser-91-Leu) обнаруживалась в геноме микоплазмы и в последовательности гена, транспортируемой везикулами *A. laidlawii* PG8R₁₀. Наличие нуклеотидных последовательностей ДНК в составе ВВ бактерий определяет потенциальную возможность латерального переноса генов и, соответственно, распространения детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам в бактериальных популяциях (Manning, Kuehn // Microbiol. 2011. Vol.11).

2.3. Сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей ДНК клеток различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*

Данные полногеномного секвенирования бактериальных штаммов с дифференциальной чувствительностью к антибиотикам свидетельствуют, что адаптация бактерий к антибиотикам сопровождается множественными мутациями не только в генах мишенях АБП, но и многих других генах, продукты которых участвуют в фундаментальных клеточных процессах, в том числе реализации универсального каскада стресс-ответа и вирулентности микроорганизмов (Traglia *et al.* // Genome Biol. Evol. 2014. Vol.6; Peng *et al.* // BMC Genomics. 2014. Vol.15). Это оказалось справедливым и для мельчайших прокариот.

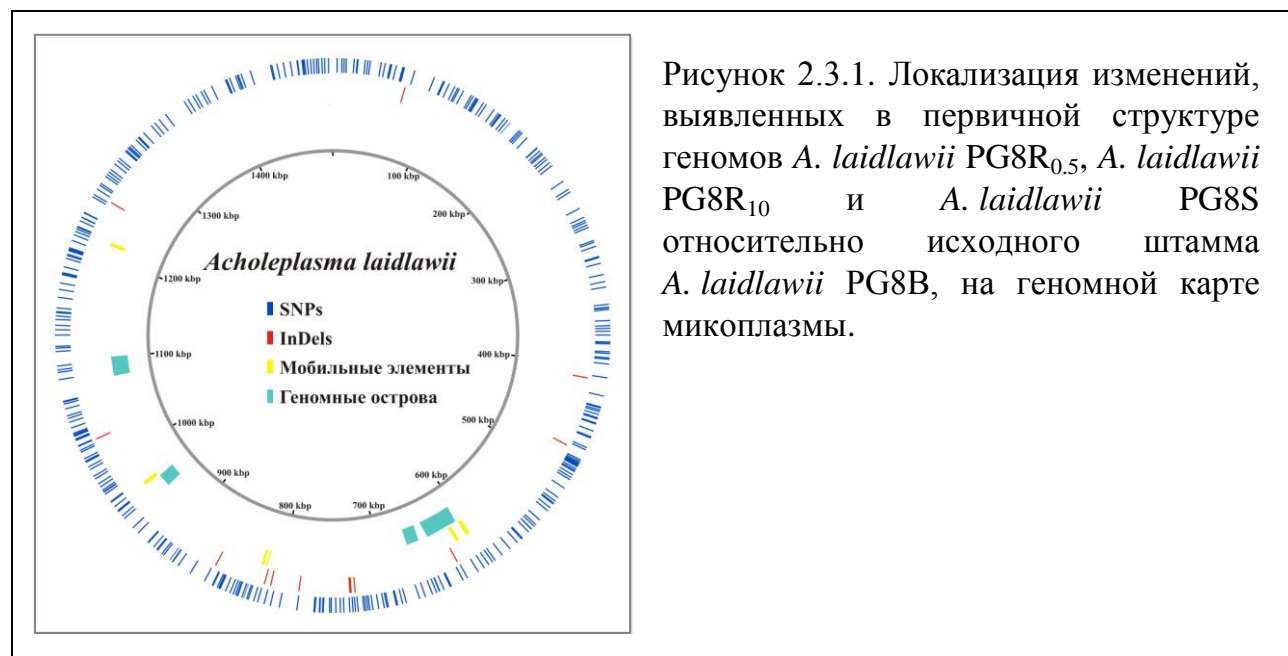
Результаты выполненного нами полногеномного секвенирования штаммов *A. laidlawii* свидетельствуют о множественных различиях как в кодирующей, так и не кодирующей частях геномов микоплазмы, связанных со вставками и делециями нуклеотидов (Indels), а также однонуклеотидными заменами (SNPs) (Таблица 2.3.1, Рисунок 2.3.1).

Таблица 2.3.1. Основные характеристики геномов штаммов *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R_{0.5}, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S

Геномные характеристики	<i>A. laidlawii</i>			
	PG8B	PG8R _{0.5}	PG8R ₁₀	PG8S
размер, п.о.	1490934	1481585	1487042	1490262
количество генов*	1514	1480	1469	1496
количество генов, кодирующих белки*	1466	1432	1421	1448
количество мутаций:				
SNPs	–	271	182	200
Indels	–	262	178	193
	–	9	4	7

*Гены, для которых достоверно (согласно программному определению) найдены гомологи у референтного штамма *A. laidlawii* PG-8A. Составлено на базе системы IMG (<https://img.jgi.doe.gov>).

Для оценки вероятности вовлечения тех или иных мутаций в развитие устойчивости микоплазмы к ципрофлоксацину нами было проведено также секвенирование генома *A. laidlawii* PG8R_{0.5} и сравнение геномных профилей штаммов *A. laidlawii* PG8R₁₀, *A. laidlawii* PG8R_{0.5} и *A. laidlawii* PG8S. В результате выполненного анализа были обнаружены мутации в генах мишеней фторхинолонов и белков эффлюксных помп – *gyrA*, *parC*, *acl_0888*, *acl_1237*, *acl_0417* у *A. laidlawii* PG8R₁₀; *gyrA*, *parC*, *acl_0884*, *acl_1237*, *acl_0417* у *A. laidlawii* PG8R_{0.5}; *acl_0418*, *acl_1237* у *A. laidlawii* PG8S.



У всех трех штаммов микоплазмы были обнаружены мутации в генах, продукты которых ассоциированы с адаптацией ряда бактерий к другим антимикробным препаратам – *acl_0211* (кодирует гидролазу β-лактамазного семейства) и *rpoB* (кодирует β-субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы). Мутации в последовательности гена *acl_0211* ассоциированы с формированием устойчивости к пенициллинам и цефалоспорином, а *rpoB* – к рифампицину (Mariam *et*

al // Antimicrob Agents Chemother. 2004. Vol.48; Su *et al.* // Microbial drug resistance. 2013. Vol.24). Поскольку в отношении этих АБП микоплазмы индифферентны, назначение этих мутаций у *A. laidlawii* представляет особый интерес. Возможно, они обеспечивают адаптацию к соответствующим антибиотикам у бактерий, важных для выживания микоплазмы в соответствующей экосистеме. Примеры такой взаимопомощи в микробных сообществах в литературе описаны (Huddleston // Infect Drug Resist. 2014. Vol.7).

Помимо вышеуказанных генов, в геномах исследуемых штаммов микоплазмы нами обнаружены мутации в генах, кодирующих белки, вовлеченные в универсальный каскад ответных реакций бактерий на стрессоры, связанные с SOS-ответом, делением клетки, а также метаболизмом АФК и компонентами электрон-транспортной цепи (Kohanski *et al.* // Nat Rev Microbiol. 2010. Vol.8). Так, у штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀ были зарегистрированы мутации в генах *ruvB*, *recN*, *mutL*, *mutS2*, *mutS*, *polC* (SOS-ответ), *ftsH*, *gidA*, *metK2* (деление клетки), *trx*, *trxB3* (метаболизм АФК) и *atpC*, *atpF*, *atpE*, *atpB*, *ntpC*, *ntpI1*, *ntpI2* (компоненты электрон-транспортной цепи); у штамма *A. laidlawii* PG8R_{0.5} – в генах *uvrD*, *mucB*, *recN*, *mutL*, *mutS*, *polC* (SOS-ответ), *ftsZ*, *ftsH*, *gidA*, *metK2* (деление клетки), *trxB3*, *ppa*, *cdr* (метаболизм АФК) и *nqrF*, *atpF*, *ntpC* (электрон-транспортная цепь); у штамма *A. laidlawii* PG8S – в *uvrA*, *recN*, *mutL*, *mutS2*, *mutS*, *polC* (SOS-ответ), *ftsZ*, *ftsH*, *gidA*, *metK2* (деление клетки), *trxB3*, *ppa*, *cdr*, *fur*, *tig* (метаболизм АФК) и *nqrC*, *atpF*, *atpC*, *ntpC*, *ntpI2* (компоненты электрон-транспортной цепи). Однако подавляющее большинство мутаций у штаммов микоплазмы оказалось в генах, кодирующих ключевые ферменты биохимических реакций, например трансляции, энергообразования, транспорта и метаболизма аминокислот и углеводов, а также факторы бактериальной вирулентности.

После сравнительного анализа первичных последовательностей *A. laidlawii* PG8R₁₀, *A. laidlawii* PG8R_{0.5} и *A. laidlawii* PG8S и исключения из пула общих мутаций *A. laidlawii* PG8S можно предположить, что в формирование устойчивости микоплазмы к цiproфлоксацину могут быть вовлечены также гены *pfl* (кодирует пируват-формиатлиазу, катализирующую превращение пирувата в ацетил-СоА и формиат), *acl_0659* (кодирует пермеазный белок транспортной системы АВС-типа, участвующий в транспорте сахаров и глицерол-3-фосфата) и *acl_1164* (кодирует интегральный мембранный белок, участвующий в транспорте кофакторов) – мутации в этих генах регистрировались у *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8R_{0.5}.

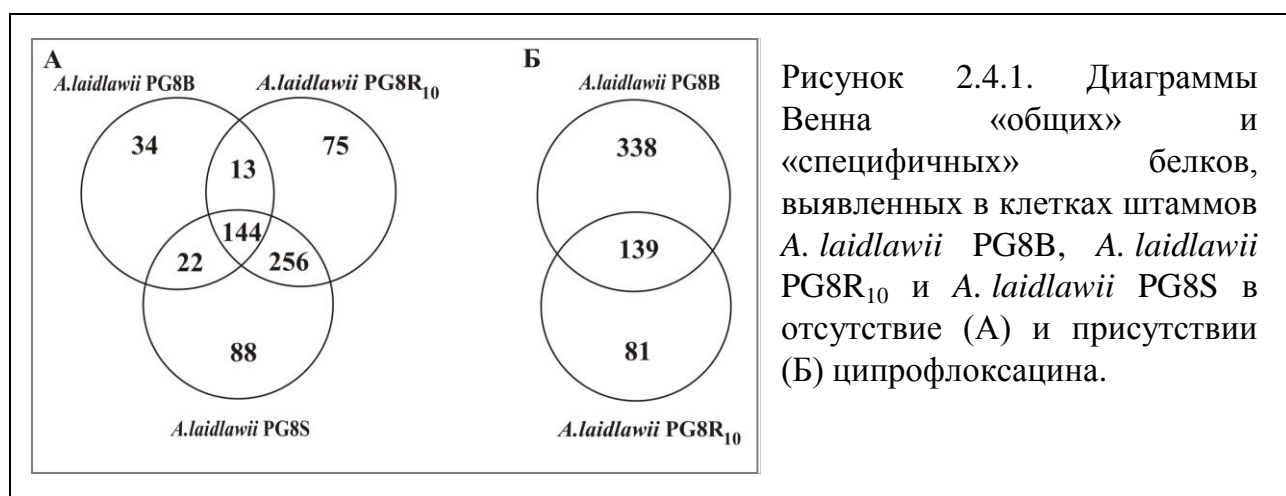
Значительный интерес с точки зрения универсальных базовых элементов адаптации к стрессорам представляет сравнительный анализ геномов штаммов с дифференциальной чувствительностью к одному и тому же АБП у разных микроорганизмов. Однако в отношении цiproфлоксацина пока есть сведения только для *P. aeruginosa* (Breidenstein *et al.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. Vol.52). У штаммов *A. laidlawii* и *P. aeruginosa* нами были выявлены четыре общих мутантных гена – *xerD* (кодирует сайт-специфическую тирозиновую рекомбиназу, участвующую в рекомбинации) у чувствительных к цiproфлоксацину штаммов, а также *mutS/mutL* (кодируют белки мисмэтч репарации ДНК) и *gidA* (кодирует тРНК уридин 5-карбоксиметиламинометил-модифицирующий белок GidA) у устойчивых штаммов соответственно (Su *et al.* // Microbial drug resistance. 2013. Vol.24). Гены *mutS*, *mutL* и *gidA* вовлечены в универсальный каскад бактериальной реактивности на стрессоры. В этой связи соответствующие гены и их продукты представляют особый интерес как с

точки зрения фундаментальных механизмов адаптации бактерий к антимикробным препаратам, так и практических разработок таргетного контроля инфектов.

2.4. Сравнительный анализ протеомов клеток у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*

Реактивность бактерий в отношении стрессоров, в том числе антибиотиков, ассоциирует с существенными изменениями клеточного протеома. Для выявления белков-кандидатов, участвующих в формировании устойчивости микоплазмы к ципрофлоксацину нами было выполнено протеомное профилирование штаммов *A. laidlawii* PG8B (*A. laidlawii* PG8B^{CIP-}), *A. laidlawii* PG8R₁₀ (*A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}) и *A. laidlawii* PG8S (*A. laidlawii* PG8S^{CIP-}), а также *A. laidlawii* PG8B, обработанного ципрофлоксацином (*A. laidlawii* PG8B^{CIP+}), и штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀, выращенного на среде без ципрофлоксацина (*A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}).

С помощью 1D-LC-ESI-MS/MS в клетках штаммов микоплазмы нами были идентифицированы 1908 полипептидов (213 у *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, 477 у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, 220 у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, 488 у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-} и 510 у *A. laidlawii* PG8S) и выявлены особенности протеомных профилей у штаммов, связанные с дифференциальной экспрессией белков. Результаты сравнительного анализа спектров идентифицированных белков свидетельствуют о существенных различиях клеточных протеомов как у разных штаммов, так и у штаммов внутри пар в присутствии/отсутствии АБП. В белковых спектрах штаммов обнаружены «общие» и «специфичные» белки (Рисунок 2.4.1).



Дифференциальность полипептидных спектров у штаммов внутри пар оказалась связана с мишенями фторхинолонов, а также других антимикробных препаратов, белками универсального каскада стрессового ответа бактерий, фундаментальных клеточных процессов и реализации вирулентности. Так, целевые белки фторхинолонов GyrA, ParC, ACL_0232, ACL_0233, ACL_0760, ACL_0993, ACL_0994, ACL_1237, ACL_1305 оказались выраженными в спектре у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, (но не *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}); ACL_0844 – у *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, но не *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}; ACL_0418 – у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, (но не *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}). GyrA, ACL_0417, ACL_0993, ACL_0994, ACL_1237, ACL_1305 – у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}, (но не у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}). При этом в спектре мажорных

полипептидов у штаммов в присутствии ципрофлоксацина обнаружались целевые белки АБП группы PhLOPSA (ACL_0251) и рифампицина (RpoB) у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} и *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, а также аминокликозидов (ACL_0064) и макролидов (RplD) у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}. Причинно-следственные связи этого феномена для *A. laidlawii* и микроорганизмов, делящих общие эконисы с этой микоплазмой, еще предстоит выяснить.

Существенные различия в протеомных профилях штаммов проявились и в отношении белков стресс-ответа. Так, у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} (но не у *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}) в спектре мажорных белков оказались RecA, Ssb, UvrA, UvrB, UvrD, DinB, RuvA, RuvB, PolC, HolA, DnaQ, DnaX, LigA (SOS-ответ), Lon, YihA, PlsX, FtsH (деление клетки), AhpC, TrxR, Gpx, Ppa, Cdr, Dps, MarR (метаболизм АФК), NqrC, AtpG, AtpA, NtpA1, NtpA2, NtpB1, NtpB2, NtpD1, NtpI1, NtpI2, NtpK (электрон-транспортная цепь), а также SufS, SufB (Fe-S кластер); у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} (но не *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}) – UvrD (SOS-ответ), Trx, TrxB2, Grx (метаболизм АФК) и NtpG (электрон-транспортная цепь).

Значительная часть «специфичных» белков у штаммов была представлена белками, участвующими в фундаментальных клеточных процессах – трансляции, транспорте и метаболизме углеводов и аминокислот, репликации, репарации, рекомбинации, энергообразовании и реализации вирулентности. Предполагается, что у бактерий при адаптации к антибиотикам происходят значительные изменения метаболических процессов, связанных с энергообразованием, репликацией, репарацией, рекомбинацией, транскрипцией, транспортом и метаболизмом нуклеотидов, биогенезом мембран (Hao *et al.* // Antimicrob Agents Chemother. 2013. Vol.57; Handel *et al.* // Antimicrob Agents Chemother. 2013. Vol.57). В пользу этого предположения свидетельствуют и полученные нами данные.

«Общие» белки в спектрах *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} и *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} (не выраженные у *A. laidlawii* PG8S^{CIP-}), представляют особый интерес с точки зрения общего и особенного в ответных реакциях штаммов на ципрофлоксацин. Однако у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} и *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} были обнаружены только два таких белка – ACL_0864 (гипотетический белок) и TrxB2 (тиоредоксинредуктаза, ассоциированная с факторами бактериальной вирулентности). Значительные различия протеомных профилей у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} и *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} могут свидетельствовать о разных стратегиях реактивности штаммов в отношении АБП. Большое количество белков стресс-ответа, идентифицированных у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, может указывать на существенный вклад универсального каскада стресс-реактивности в ответные реакции лабораторного штамма микоплазмы на ципрофлоксацин. В случае же *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} ответ на АБП, вероятно, связан с глобальной перестройкой биохимических процессов, в том числе генетически опосредованной.

2.5. Сравнительный анализ протеомных профилей внеклеточных везикул у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*

Модуляция клеточного протеома может существенным образом отражаться на секретоме, ассоциированном с внеклеточными везикулами (Park *et al.* // Front. Microbiol. 2014. Vol.38). Свидетельство в пользу этого положения было получено и в наших исследованиях.

Количество белков, идентифицированных в везикулах штаммов *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}, *A. laidlawii* PG8S^{CIP-}, существенно различается. Всего было идентифицировано 273 везикулярных белка – 97 у *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, 62 у *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, 17 у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, 19 у *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-} и 78 у *A. laidlawii* PG8S. В составе везикулярных белков обнаруживаются целевые белки цiproфлоксацина, а также других АБП, универсального каскада стресс-реактивности, фундаментальных клеточных процессов и вирулентности. При этом в везикулах всех штаммов преобладают цитоплазматические белки; значительную долю составляют белки, участвующие в энергообразовании, трансляции, а также транспорте и метаболизме углеводов. Спектры везикулярных белков у *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀, *A. laidlawii* PG8S различаются как у разных штаммов, так и одного и того же штамма в присутствии/отсутствии АБП (Рисунок 2.5.1).

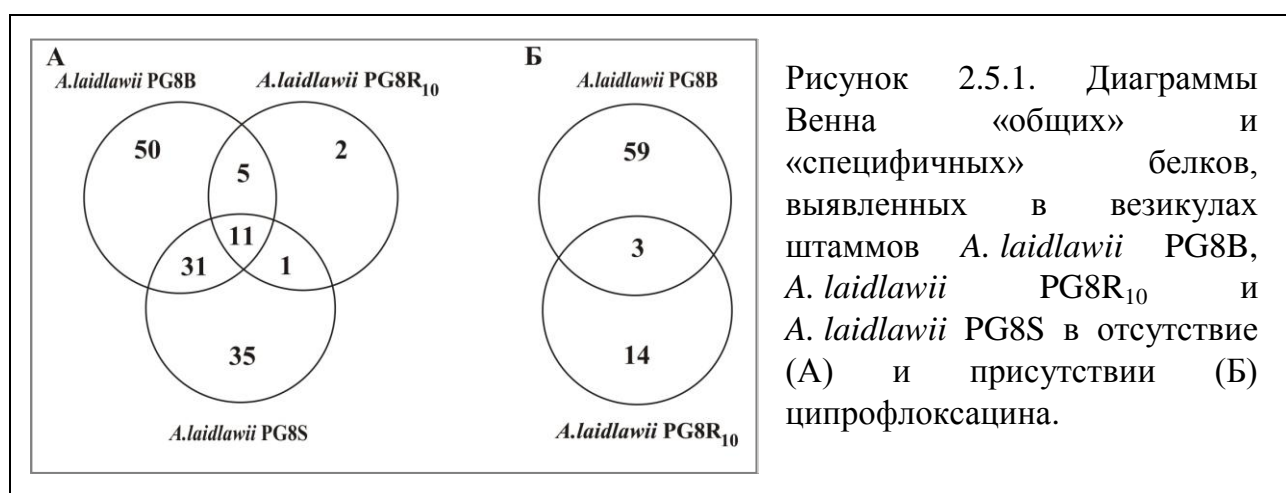


Рисунок 2.5.1. Диаграммы Венна «общих» и «специфичных» белков, выявленных в везикулах штаммов *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S в отсутствие (А) и присутствии (Б) цiproфлоксацина.

Так, в везикулах *A. laidlawii* PG8B^{CIP-} идентифицирован целевой белок фторхинолонов – GyrA, тогда как в везикулах *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, *A. laidlawii* PG8R₁₀ (^{CIP+}/^{CIP-}) и *A. laidlawii* PG8S^{CIP-} этот белок не обнаружился. Вместе с тем в везикулах *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, а также *A. laidlawii* PG8S^{CIP-} выявлен целевой белок макролидов (RplD), который не обнаружился у *A. laidlawii* PG8B^{CIP-} и *A. laidlawii* PG8R₁₀ (^{CIP+}/^{CIP-}).

В везикулярном спектре полипептидов *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} были идентифицированы белки SOS-ответа (RecA), деления клетки (FtsZ), метаболизма АФК (Cdr), электрон-транспортной цепи (NtpB1) и Fe-S кластера (SufB), которые, однако, не были обнаружены в везикулах *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}; в везикулах *A. laidlawii* PG8S^{CIP-} были идентифицированы белки метаболизма АФК (Cdr) и электрон-транспортной цепи (NtpB1). В везикулах *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} белки соответствующих групп не были выявлены, но были идентифицированы два белка – ACL_0611 (пептидаза U35, связывающая белки капсида вирусов (Cheng *et al.* // Protein Sci. 2004. Vol. 13)) и ACL_0895 (ComEC-подобный белок, определяющий генетическую трансформацию у бактерий (Friedrich *et al.*, Appl Environ Microbiol. 2001. Vol.67)), которые представляют значительный интерес с точки зрения вовлечения генетической трансформации, горизонтального переноса генов в механизмы адаптации к стрессорам (Chattopadhyay, Jagannadham // Front Microbiol. 2015. Vol.6). Полученные нами данные могут указывать на существенные различия

реализации программы стресс-реактивности у штаммов *A. laidlawii* PG8B и *A. laidlawii* PG8R₁₀, ассоциированной с везикулярным трафиком.

Значительную часть белков в составе ВВ составляют факторы вирулентности бактерий (38%, 50%, 41%, 74% и 50% для *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, *A. laidlawii* PG8B^{CIP+}, *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}, *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-} и *A. laidlawii* PG8S^{CIP-} соответственно), но спектр их у штаммов различается. При этом в везикулярном пуле *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}, *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP-}, а также *A. laidlawii* PG8S^{CIP-} регистрируется глобальный регулятор вирулентности – полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансфераза (PNPase), тогда как в везикулах *A. laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+} и *A. laidlawii* PG8B^{CIP+} этот белок не обнаруживается. PNPase участвует в инвазии бактериальных патогенов и их внутриклеточной репликации (Clements *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. Vol.99). Отсутствие этого белка в везикулах соответствующих штаммов может указывать на изменение стратегии в отношении проявления патогенности у инфектов в присутствии АБП.

2.6 Сравнительный анализ вирулентности внеклеточных везикул у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii*

Ранее было установлено, что *A. laidlawii* обладает токсигенным и мутагенным потенциалом и показано, что везикулы микоплазмы (*A. laidlawii* PG8B^{CIP-}) могут проявлять мутагенный эффект в отношении лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* (Chernov *et al.* // J. Proteomics. 2014. Vol.110). Однако сведения о генотоксичных свойствах ВВ бактериальных штаммов с дифференциальной чувствительностью к АБП в литературе отсутствуют.

В результате сравнительного анализа внеклеточных везикул у различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину штаммов *A. laidlawii* на генотоксичность нами было обнаружено, что ВВ штаммов *A. laidlawii* могут индуцировать геномные нарушения – гипоплоидию – и подавление митотической активности у лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* (Рисунок 2.6.1). При этом оказалось, что развитие устойчивости к ципрофлоксацину у микоплазмы сопровождается повышением митотоксичности и снижением мутагенности.

В составе везикул, продуцируемых клетками всех штаммов микоплазмы, нами были выявлены общие белки – енолаза и фактор элонгации Tu, которые ассоциированы с бактериальной вирулентностью (Henderson, Martin // Curr Top Microbiol Immunol. 2013. Vol.358). Эти белки могут индуцировать универсальный каскад ответных реакций эукариотной клетки на бактериальную адгезию, обуславливающих задержку клеточного деления. Однако существенные различия в уровне митотоксичности и мутагенности ВВ у *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S позволяют предположить возможность вовлечения также других компонентов в реализацию генотоксичности. Так или иначе, присутствие в везикулах факторов бактериальной вирулентности у всех штаммов микоплазмы и генотоксичность, проявляемая ВВ в отношении эукариотных клеток, определяют необходимость коррекции системы контроля микоплазменных инфекций с учетом инфектов нового типа.

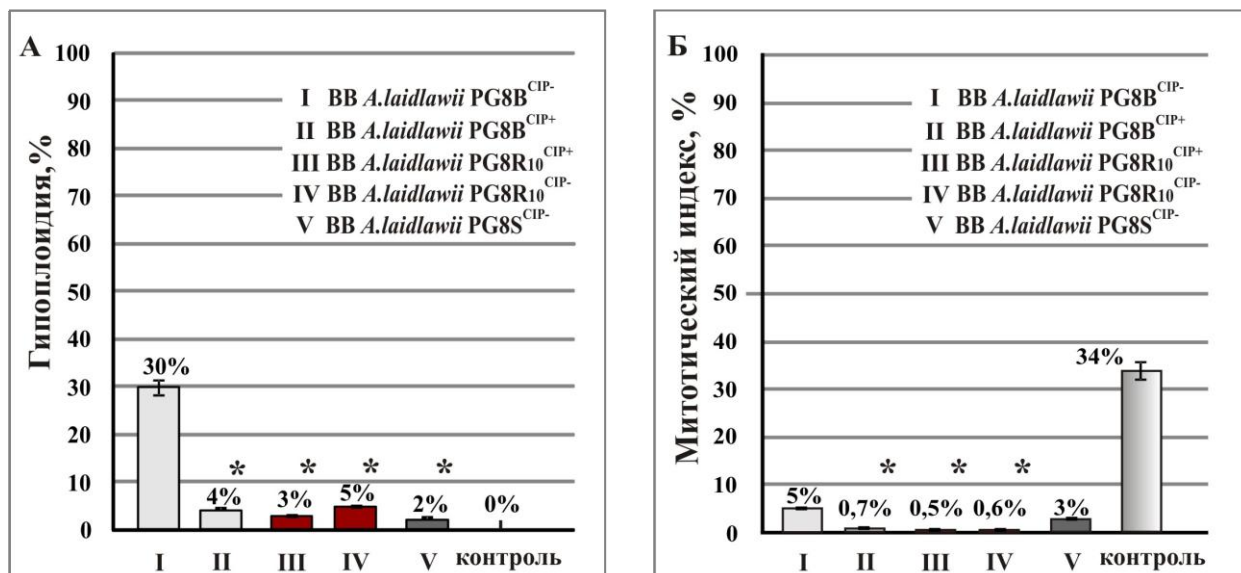


Рисунок 2.6.1. Мутагенность (А) и митотоксичность (Б) везикул штаммов *A. laidlawii*. Контроль – лимфоциты периферической крови человека, культивированные на среде без инфектов. * – $p < 0.05$ по сравнению с везикулами *A. laidlawii* PG8B^{CIP-}.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение омикс технологий в практику биологических исследований обеспечило новые возможности определения молекулярных основ адаптации микроорганизмов. В результате комплексного подхода, основанного на использовании классических и современных методов физико-химической биологии, впервые выполнен сравнительный анализ геномного и протеомного профилей штаммов *A. laidlawii*, проявляющих дифференциальную чувствительность к ципрофлоксацину – широко используемому для подавления микоплазм АБП группы фторхинолонов. При этом было установлено, что развитие устойчивости *A. laidlawii* к АБП сопровождается значительными изменениями в геномном и протеомном профилях микоплазмы, связанными не только с генами мишеней фторхинолонов и соответствующих целевых белков, но и многими другими генами и белками, которые участвуют в фундаментальных клеточных процессах, универсальном каскаде стрессового ответа бактерий и реализации вирулентности. Полученные данные в основном укладываются в представления о тахителичности микоплазм, отличающихся повышенным мутационным темпом (Waites *et al.* // In Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. UK: Caister Academic Press. 2014), а также ответных реакциях бактерий на стрессоры (Kohanski *et al.* // Nat Rev Microbiol. 2010. Vol.8): стрессор – ДНК-повреждения, вызванные АФК, – индукция SOS-репарации, обуславливающая задержку деления клеток (связывание FtsZ белков), мутагенез и горизонтальный перенос генов, важным посредником которого являются внеклеточные везикулы. В таблице 1 перечислены гены и белки *A.laidlawii*, которые, согласно анализу массива данных, полученных в нашем исследовании, с высокой долей вероятности могут участвовать в развитии устойчивости микоплазмы к ципрофлоксацину. Вклад каждого из этих генов и белков в адаптацию микоплазмы к

АБП еще предстоит оценить. Вместе с тем значительное количество вовлеченных в фундаментальные клеточные процессы генов и белков, выявленных в нашей работе в связи с развитием устойчивости *A.laidlawii* к ципрофлоксацину, позволяет предполагать, что механизмы формирования резистентности микоплазмы к фторхинолонам сложнее и могут быть связаны с существенной перестройкой биохимических процессов в клетке бактерии.

Таблица 1. Молекулярные основы развития устойчивости *A. laidlawii* к ципрофлоксацину – белки и гены как вероятные участники процессов

Категория	Ген	Белок (локус гена)
Целевые белки	<i>gyrA</i>	ДНК-гираза, субъединица α (ACL_0007)
	<i>parC</i>	ДНК-топоизомераза, субъединица α (ACL_0380)
	<i>acl_0417</i>	Транспортная система ABC-типа (ACL_0417)
	<i>acl_0888</i>	Транспортная система ABC-типа, пермеаза (ACL_0888)
	<i>acl_0884</i>	Транспортная система ABC-типа, АТФ-связывающий белок (ACL_0884)
	<i>acl_1237</i>	Транспортная система ABC-типа (ACL_1237)
SOS-ответ	<i>ruvB</i>	ДНК-хеликаза RuvB (ACL_0370)
	<i>mucB</i>	ДНК-полимераза IV (ACL_0480)
	<i>mutS2</i>	Белок мисмэтч репарации MutS2 (ACL_0814)
	<i>uvrD</i>	ДНК-хеликаза II (ACL_1351)
АОЗ	<i>trx</i>	Тиоредоксин (ACL_0813)
	<i>trxB2</i>	Тиоредоксинредуктаза (ACL_0467)
	<i>acl_1203</i>	Белок, содержащий глутаредоксин-подобный домен (ACL_1203)
	<i>acl_0670</i>	Глутаредоксинпероксидаза (ACL_0670)
	<i>acl_1420</i>	Глутаредоксинпероксидаза (ACL_1420)
	<i>cdr</i>	СоА-дисульфид редуктаза (ACL_1035)
Компоненты электрон-транспортной цепи	<i>atpE</i>	H ⁺ -транспортирующая АТФаза F-типа, субъединица C (ACL_0987)
	<i>atpB</i>	H ⁺ -транспортирующая АТФаза F-типа, субъединица A (ACL_0988)
	<i>ntp11</i>	H ⁺ -транспортирующая АТФаза V-типа, субъединица I (ACL_0978)
	<i>nqrF</i>	Na ⁺ -транспортирующая NADH:убихинон оксидоредуктаза, субъединица F (ACL_0970)
Fe-S кластер	<i>sufS</i>	Цистеиндесульфурилаза (ACL_1215)
Общие мутантные гены у штаммов R ₁₀ и R _{0.5}	<i>pfl</i>	Пируват-форматлиаза (ACL_0028)
	<i>acl_0659</i>	Транспортная система ABC-типа, пермеаза (ACL_0659)
	<i>acl_1164</i>	Интегральный мембранный белок (ACL_1164)
Общие белки у штаммов R ₁₀ ^{CIP+} и PG8B ^{CIP+}	<i>speB</i>	Предполагаемая агматиназа (ACL_1316)
	<i>acl_0864</i>	Гипотетический белок (ACL_0864)
	<i>pyrH</i>	Уридилаткиназа (ACL_1155)
Общие мутантные гены у <i>A.laidlawii</i> PG8R ₁₀ и <i>P.aeruginosa</i>	<i>mutS</i>	Белок мисмэтч репарации (ACL_0883)
	<i>mutL</i>	Белок мисмэтч репарации (ACL_0882)
	<i>gidA</i>	тРНК уридин 5-карбоксиметиламинотетра-модифицирующий белок GidA (ACL_0063)
Белки везикул, участвующие в ГПГ	<i>acl_0611</i>	Пептидаза U35 (ACL_0611)
	<i>acl_0895</i>	ComEC-подобный белок (ACL_0895)

Сокращения в таблице 1: R₁₀ – *A.laidlawii* PG8R₁₀; R_{0.5} – *A.laidlawii* PG8R_{0.5}; R₁₀^{CIP+} – *A.laidlawii* PG8R₁₀^{CIP+}; PG8B^{CIP+} – *A.laidlawii* PG8B^{CIP+}; ГПГ – горизонтальный перенос генов.

- гены, ассоциированные с развитием устойчивости *A. laidlawii* к ципрофлоксацину;
- белки, ассоциированные с развитием устойчивости *A. laidlawii* к ципрофлоксацину;
- гены и белки, ассоциированные с развитием устойчивости *A. laidlawii* к ципрофлоксацину.

Адаптация микоплазмы к АБП, как и других бактерий, вероятно, определяется работой «генных сетей», в которые вовлечены сотни генов, обеспечивающих динамичное равновесие процессов в бактериальной клетке и оперативное репрограммирование их в различных условиях среды (Kohansky *et al.* // Nat Rev Microbiol. 2010. Vol.8). Изучение этих сетей только начинается, и перспективы соответствующих исследований связывают с развитием методов высокого разрешения.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *A. laidlawii* PG8R₁₀ (МИК – 20 мкг/мл) и *A. laidlawii* PG8S (МИК – 0.2 мкг/мл) проявляют к ципрофлоксацину соответственно повышенную устойчивость и чувствительность относительно исходного родительского штамма *A. laidlawii* PG8B (МИК – 0.5 мкг/мл) и имеют существенные различия в отношении эффлюкса антибиотика.

2. Внеклеточные везикулы *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S содержат специфичный набор нуклеотидных последовательностей ДНК генов, определяющий возможность дифференциальной детекции везикулярных и клеточных препаратов, и участвуют в развитии устойчивости микоплазмы к фторхинолонам – опосредуют перенос ципрофлоксацина и мутантных генов мишеней фторхинолонов.

3. Штаммы *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S имеют существенные различия в отношении геномного профиля. Различия связаны не только с первичной структурой генов целевых белков, но и генов, продукты которых вовлечены у бактерий в фундаментальные клеточные процессы, универсальный каскад стресс-ответа и реализацию вирулентности.

4. Штаммы *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S имеют существенные различия в отношении клеточного протеома. Различия связаны с белками, участвующими у бактерий в фундаментальных клеточных процессах, стресс-реактивности и реализации вирулентности.

5. Штаммы *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S имеют существенные различия в отношении протеомного профиля внеклеточных везикул. Различия связаны с количеством, а также спектром белков, значительную часть которого в везикулах всех штаммов составляют факторы бактериальной вирулентности.

6. Внеклеточные везикулы штаммов *A. laidlawii* PG8B, *A. laidlawii* PG8R₁₀ и *A. laidlawii* PG8S проявляют генотоксичность в отношении лимфоцитов периферической крови человека. Развитие устойчивости к ципрофлоксацину у микоплазмы сопровождается повышением митотоксичности и снижением мутагенности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК

1. Chernov, V.M. Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins / V.M. Chernov, A.A. Mouzykantov, N.B. Baranova, E.S. Medvedeva, **T.Y. Grygorieva (Malygina)**, M.V. Trushin, I.E. Vishnyakov, A.V. Sabantsev, S.N. Borchsenius, O.A. Chernova // JProteomics. – 2014. – V. 110. – P. 117-128 (перечень ВАК), автора - 0.075 п.л.
2. Medvedeva, E.S. Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target / E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, A.A. Mouzykantov, **T.Y. Grygorieva (Malygina)**, M.N. Davydova, M.V. Trushin, O.A. Chernova, V.M. Chernov // ScientificWorldJournal. – 2014:150615 (перечень ВАК), автора - 0.037 п.л.
3. Медведева, Е.С. Внеклеточные везикулы микоплазм и формирование устойчивости бактерий к фторхинолонам / Е.С. Медведева, Н.Б. Баранова, А.А. Музыкантов, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, М.Н. Давыдова, О.А. Чернова, В.М. Чернов // ДАН. – 2014. – Т. 454, № 6. – С. 725-728 (перечень ВАК), автора - 0.042 п.л.
4. Музыкантов, А.А. Экспортируемые белки микоплазм: протеом экстраклеточных мембранных везикул *Acholeplasma laidlawii* PG8 / А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, Е.С. Медведева, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, О.А. Чернова, В.М. Чернов // ДАН. – 2014. – Т. 455, № 1. – С. 99-104 (перечень ВАК), автора - 0.05 п.л.
5. Медведева, Е.С. Геномный и протеомный профили штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину / Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, М.Н. Синягина, Е.А. Булыгина, О.А. Чернова, В.М. Чернов // ДАН. – 2016. – Т. 466, № 2. – С. 228–232 (перечень ВАК), автора - 0.033 п.л.

Другие публикации

6. Медведева, Е.С. Механизмы устойчивости микоплазм к антибиотикам: секреция ЭКМВ и эффлюкс ципрофлоксацина у *A. laidlawii* / Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, Ю.А. Беспярых, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, О.В. Горшков, А.А. Музыкантов, Г.Ф. Шаймарданова, О.А. Чернова, В.М. Чернов // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. III международная научно-практическая конференция. Сб. тез. – Казань, Россия, 2012. – С. 299.
7. Медведева, Е.С. Формирование устойчивости микоплазм к антибиотикам: модуляция экспрессии АВС-транспортёров, мутации генов ДНК-гираз и секреция экстраклеточных мембранных везикул / Е.С. Медведева, А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, О.В. Горшков, М.Н. Давыдова, О.А. Чернова, В.М. Чернов // VI Всероссийский с международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». – Иркутск, Россия, 2013. – С. 96-97.
8. Чернов, В.М. Микоплазмы: взаимодействие с клетками эукариот, секреция везикул, диагностика и подавление / В.М. Чернов, А.А. Музыкантов, Е.С. Медведева, **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, Н.Б. Баранова, Г.Ф. Шаймарданова, М.В. Трушин, О.А. Чернова // Всероссийский симпозиум и Школа-конференция для

молодых учёных «Биология клетки в культуре» – Санкт-Петербург, 2013. – Цитология. – Т. 55. – С. 663-664.

9. **Grygoreva (Malygina), T.Y.** Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8/ **T.Y. Grygoreva**, E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, A.A. Mouzykantov, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // 5th Annual Young Researchers in Life Sciences Conference. – Paris, France, 2014. – P.128.

10. Medvedeva, E.S. Extracellular vesicles and development of resistance to fluoroquinolones in *Acholeplasma laidlawii* / E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, **T.Y. Grigoreva (Malygina)**, A.A. Mouzykantov, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // FEBS EMBO 2014 Conference. – Paris, France, 2014. – The FEBS Journal. Special Issue: V. 281, Issue Supplement s1. – P. 658.

11. Medvedeva, E.S. *A. laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and mutant gene for the antibiotic target / E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, **T.Y. Grigorieva (Malygina)**, A.A. Mouzykantov, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // The 12th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas. The 37th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Anaerobe 2014. Abstract book. – Chicago, Illinois USA, 2014. – P. 181.

12. **Григорьева (Малыгина), Т.Ю.** Молекулярные основы устойчивости микоплазм к фторхинолонам: резистом *Acholeplasma laidlawii* / **Т.Ю. Григорьева (Малыгина)**, Е.С. Медведева, А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, М.Н. Синягина, Е.А. Булыгина, М.Н. Давыдова, Г.Ф. Шаймарданова, О.А. Чернова, В.М. Чернов // Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. – Пущино, Россия, 2015. – С. 172-173.

13. Medvedeva, E.S. Extracellular vesicles and resistance of mycoplasmas to fluoroquinolones: resistome of *Acholeplasma laidlawii* / E.S. Medvedeva, N.B. Baranova, **T.Y. Grigoreva (Malygina)**, A.A. Mouzykantov, E.A. Boulygina, M.N. Siniagina, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Program book. – Maastricht, The Netherlands, 2015. – P. 120.

14. **Grigoreva (Malygina), T.Y.** Molecular basis for the development of mycoplasmas resistance to fluoroquinolones: genomic profiles of *A. laidlawii* strains, differing in sensitivity to ciprofloxacin / **T.Y. Grigoreva (Malygina)**, E.S. Medvedeva, A.A. Mouzykantov, N.B. Baranova, M.N. Siniagina, E.A. Boulygina, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // 18th Symposium for Biology Students in Europe. Abstract book. – Alexandroupoli, Greece, 2015. – P. 22.

15. Medvedeva, E.S. Genomes of *Acholeplasma laidlawii* strains differing in sensitivity to ciprofloxacin / E.S. Medvedeva, M.N. Davydova, E.A. Boulygina, M.N. Siniagina, S.Y. Malanin, N.B. Baranova, **T.Y. Grigoreva (Malygina)**, A.A. Mouzykantov, O.A. Chernova, V.M. Chernov // Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LVCP000000000.1>, свободный. – Проверено 14.09.2016.

Благодарности

Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН д.б.н., профессору Владиславу Моисеевичу Чернову за чуткое руководство, неоценимый вклад и помощь в выполнение исследований и обсуждение результатов; д.б.н., профессору О.А. Черновой за неоценимую помощь в выборе данного направления исследований, анализе результатов и написании работы, внимательное и оперативное решение проблем, всестороннюю помощь и поддержку. Диссертант выражает благодарность сотрудникам лаборатории молекулярных основ патогенеза к.б.н. Е.С. Медведевой, к.б.н. А.А. Музыкантову, к.б.н. Н.Б. Барановой, к.б.н. М.Н. Давыдовой, д.б.н. Г.Ф. Шаймардановой, к.б.н. Т.Н. Нестеровой за всестороннюю помощь в проведении работ, анализе полученных данных, поддержку и дружеское отношение.

E-mail автора: redfox-house@mail.ru

Список сокращений и условных обозначений

АБП	–	антибактериальный препарат
АСМ	–	атомно-силовая микроскопия
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФК	–	активные формы кислорода
ВВ	–	внеклеточные везикулы
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
МИ	–	митотический индекс
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
п.о.	–	пара оснований
ПСЭ	–	питательная среда Эдварда
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
рРНК	–	рибосомная рибонуклеиновая кислота
тРНК	–	транспортная рибонуклеиновая кислота
ТЭМ	–	трансмиссивная электронная микроскопия
1D	–	одномерный гель-электрофорез (one-dimensional gel electrophoresis)
COG	–	кластеры ортологичных групп белков (clusters of orthologous groups of proteins)
NCBI	–	Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnological Information)
PhLOPSA	–	группа антибиотиков: фениколы, линкозамины, оксазолидиноны, плевромутилины, стрептограмин А (Phenicol + Lincosamides + Oxazolidinones + Plevromutilines + Streptogramin A)
PNPase	–	полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансфераза (polyribonucleotide nucleotidyltransferase)

Отзывы на автореферат просим отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.